

Jahreszeitlicher Verlauf und vermutliche Bedeutung der Peroxidase in verholzten Organen von *Vitis*

von

H. SCHAEFER

Seasonal changes and presumable role of peroxidase activity in woody parts of *Vitis*

S u m m a r y . — The seasonal changes of peroxidase (PO) were investigated in several grapevine varieties by analysis of the anionic isoenzyme patterns and, partly, by quantitative determination of the total enzyme activity.

In autumn, the activity of PO increased showing a peak between the end of November and the end of December. A relation of PO to the endogenous bud dormancy and abscisic acid is assumed. During winter and especially from sprouting, the activity of PO decreased again. Since several isoenzymes also show IAA oxidase activities, a relation to the control of growth substances is to be assumed. As PO is easily influenced by exogenous factors it can be explained why bud break occurs during postdormancy by application of certain substances or by alteration of temperature. Activity of PO was greatest in canes and trunks. Changes in activity were less pronounced in the roots, which corresponds to their failure of a true rest period.

A direct relation to wood ripening could not be observed. The increasing activity of PO in the roots during April and the enhanced staining intensity or *de novo* synthesis of some isoenzymes in trunks and canes during May can be related to root formation or to shoot growth still faint by that time. The minimum of PO activity in summer corresponds to the strong growth pointing again to the participation of PO in the control of growth hormones.

Einleitung

Das Verteilungsmuster der Isoenzyme der Peroxidase (PO) unterliegt in den Rebenblättern jahreszeitlichen Schwankungen (SCHAEFER 1971). Da dieses Enzym eine größere Zahl von Stoffwechselprozessen steuert und auch bei der Entwicklung und dem Wachstum der Pflanzen eine Rolle spielen soll (BURRIS 1960, PAUL 1963), haben wir die Jahresperiodizität der Aktivität und der Isoenzymverteilung bei gleichzeitiger Analyse des Proteinstoffwechsels (SCHAEFER 1981) auch in den verholzten Rebenorganen untersucht. Wir erwarteten dabei einen weiteren Einblick u. a. in die Vorgänge der Dormanz und der Steuerung der Wachstumshormone. Dies schien auch deshalb von Bedeutung zu sein, weil über das Vorkommen der PO in Holzgewächsen recht wenig bekannt ist (KELLY und ADAMS 1977).

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an demselben Rebenmaterial wie in einer früheren Mitteilung (SCHAEFER 1981) durchgeführt.

Extraktion, Elektrophorese und Anfärbung der PO wurden schon früher beschrieben (SCHAEFER 1977). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in Anlehnung an FRIČ und FUCHS (1970) in den Ansätzen: 2,35 ml 0,2 M Na-acetat, 0,25 ml Guajakol-Benzidin-Lösung nach SCHRAUWEN (1966), 0,3 ml Probe, 0,1 ml H₂O₂ 0,12 %; alle 30 s bei 510 nm messen. Die Aktivität wird in 10³ Einheiten (E) angegeben und auf das Frischgewicht bezogen.

Ergebnisse

In den Stämmen und Trieben zeigte die PO eine starke Aktivitätserhöhung im Herbst mit Gipfel Ende November/Dezember (Abb. 1), der je nach Rebensorte und Organ schon im Winter oder erst im Frühjahr abgebaut wurde. Im 2. Untersuchungsjahr war der Anstieg nach einem erst später erfolgenden Blattfall steiler. Das Maximum war in den Wurzeln viel schwächer ausgeprägt. Hier traten, besonders bei Rotberger, weitere Gipfel zur Zeit der Laubverfärbung und Ende Mai bei noch schwachem Wachstum auf.

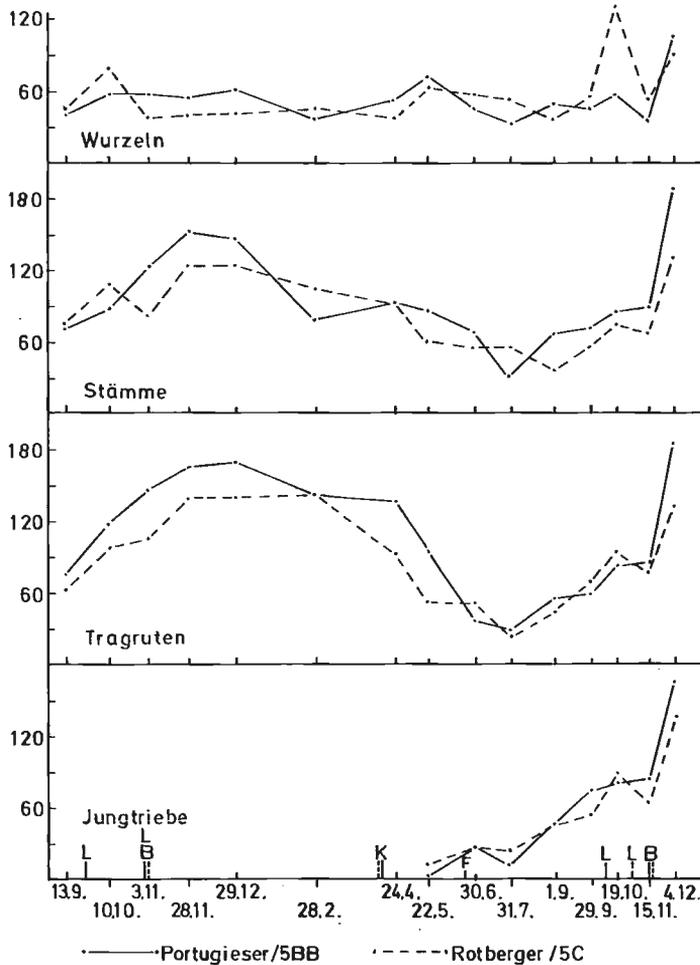


Abb. 1: Die Jahresrhythmik der Aktivität der Peroxidase in den Wurzeln, Stämmen, Tragruten und Jungtrieben von zwei Ertragsrebensorten. L = Lese, B = Blattfall, K = Knospenschwellen, F = Blüte.

Seasonal changes in the activity of peroxidase in roots, stems, canes and shoots of two bearing grapevine cultivars. L = harvest; B = leaf fall; K = bud swelling; F = flowering.

Die zuweilen fehlende Übereinstimmung zwischen den elektrophoretischen (Abb. 2) und den quantitativen Ergebnissen hängt mit einer unterschiedlichen Anfärbbarkeit von PO-Isoenzymen zusammen (GOVE und HOYLE 1975). Auch wurden die schnellwandernden Isoenzyme sehr rasch angefärbt und gestatteten häufig keine halb-quantitative Aussage. Der herbstliche Gipfel, vor allem in den Stämmen, war elektrophoretisch nur wenig erkennbar. Ab Dezember wurde ein weiteres Isoenzym mit R_f 0,33 in allen Organen festgestellt, das in Stämmen und Trieben auch im Mai verstärkt auftrat und dann bis zum Herbst nicht mehr nachweisbar war. Bei dem Ende April beginnenden Austrieb erschienen in den Wurzeln vorübergehend einige zusätzliche Isoenzyme, in den Stämmen und Trieben aber erst gegen Ende Mai zur Zeit der ersten Neubildung junger Triebe. In den jetzt 1jährigen Trieben war das Isoenzym R_f 0,60 von diesem Zeitpunkt an in etwa derselben Aktivität weiterhin nachweisbar, während es in den diesjährigen Trieben, auch bei anderen Rebensorten, fehlte. Es dürfte hier eine

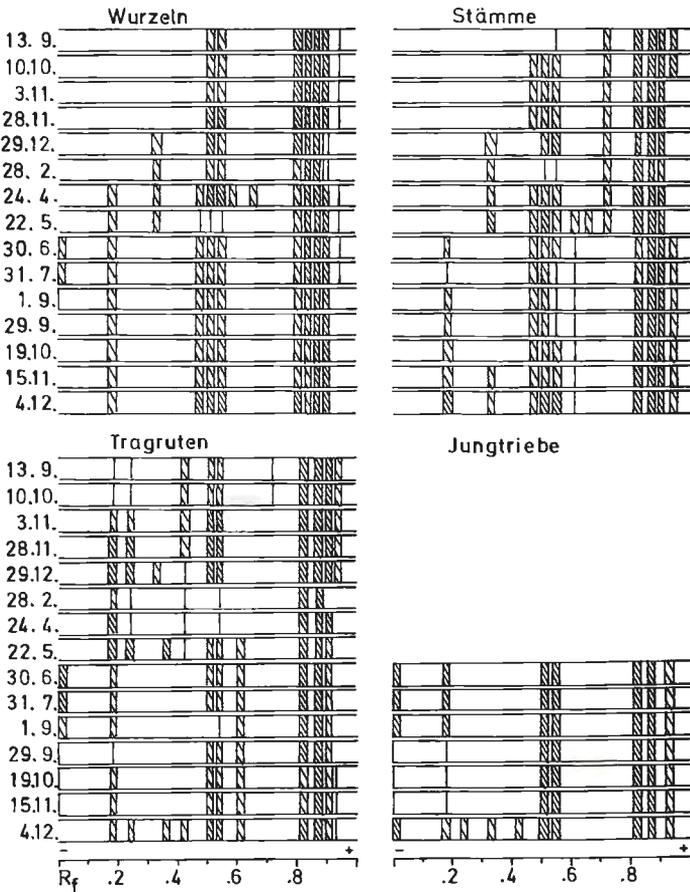


Abb. 2: Die Jahresrhythmik der Isoenzyme der Peroxidase in den verholzten Organen von Portugieser auf 5 BB.

Seasonal changes in the pattern of peroxidase isoenzymes in the woody parts of the cv. Portugieser/5 BB.

Beteiligung an der Umwandlung der dies- in die 1jährigen Triebe vorliegen. Die geringere Aktivität einzelner Isoenzyme in allen Organen Ende Februar und in den Stämmen und Trieben im Sommer entspricht meist den quantitativen Befunden.

Bei Rotberger traten ähnliche Veränderungen im Isoenzymmuster auf, dessen Spektrum sich in der Wurzel aber erst im Mai bis etwa Juli vergrößerte.

Auch bei den in größeren Abständen untersuchten Unterlagen war ein herbstliches Maximum bis in den Januar hinein erkennbar (Abb. 3), desgleichen im Mai mit einer zusätzlichen, sehr schnell laufenden Bande.

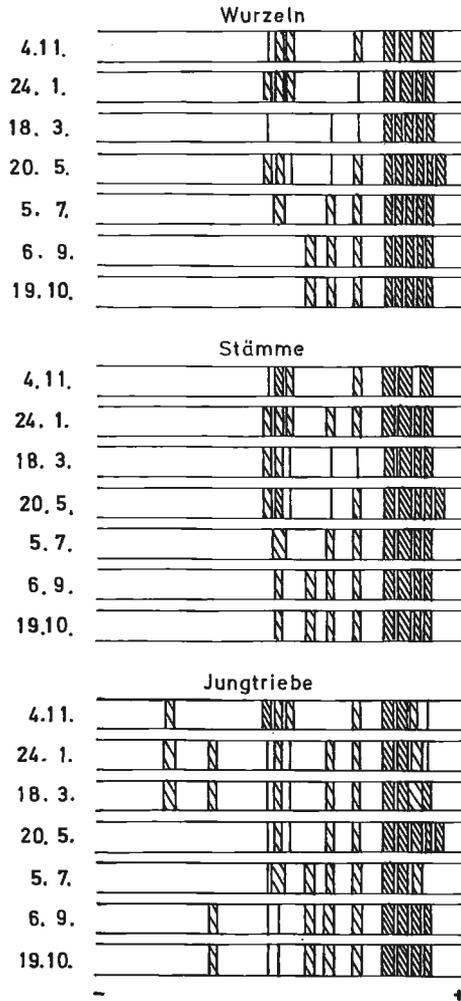


Abb. 3: Die Jahresrhythmik der Isoenzyme der Peroxidase in den Wurzeln, Wurzelstangen und Jungtrieben der Unterlage 5 BB.

Seasonal changes in the pattern of peroxidase isoenzymes in roots, stems and shoots of the rootstock 5 BB.

In Jungreben, deren Ergebnisse bezüglich der PO früher nur sehr kurz gestreift wurden (SCHAEFER 1978 a), erschienen ab Mitte Oktober in den Wurzeln, Stämmen und Jungtrieben, nicht aber im Edelreis, zwei zusätzliche Banden mit R_f 0,60 und 0,64 sowie in allen Organen zwei langsame multiple Formen. Die beiden in Gelmitte liegenden Isoenzyme fehlten in den noch jungen Wurzeln und waren in den Stangen auch nur in der ersten Phase nach der Veredlung sowie Anfang Juli nachweisbar.

Diskussion

Die vorliegenden wie auch frühere Untersuchungen der verschiedenen Internodien von Trieben (SCHAEFER 1980) lassen keine direkten Beziehungen zwischen Holzreife und Gesamtaktivität der PO (FREUDENBERG 1956) erkennen. Dagegen spricht auch die vorübergehende Abnahme der Aktivität im November, die auch bei vier weiteren Rebenorten (unveröffentlicht) auftrat. Die Befunde schließen jedoch eine solche Funktion der PO bei den Reben nicht aus, da sie vielleicht von anderen Vorgängen überlagert sein oder kationisch auftreten kann.

KOCHHAR *et al.* (1978) schließen aus ihren Untersuchungen an Rebentrieben auf eine Beteiligung der PO an der Phase der endogenen Ruhe. Ihre quantitativen Analysen bedürfen jedoch einer Überprüfung, denn eingehende Untersuchungen (SCHAEFER 1978 b) hatten die Fragwürdigkeit der Proteinbestimmung nach Lowry in verholzten Rebenorganen wie auch die Ineffizienz der verwendeten Extraktionsmethode herausgestellt. Zudem treten große Schwankungen der Proteinkonzentration in dieser Jahreszeit auf. Rechnet man unsere Analysenwerte der PO auf den zu derselben Zeit vorliegenden Proteingehalt (SCHAEFER 1981) um, dann beobachtet man eine fallende und nicht eine steigende Tendenz der spezifischen Aktivität der PO zwischen Oktober und Ende April, besonders stark bei Rotberger.

Zwischen Ruheperiode und PO-Aktivität könnte aber insofern eine Beziehung angenommen werden, als die Veränderungen der Enzymaktivität ziemlich parallel zu den Gehalten der für die endogene Ruhe mitverantwortlichen Abscisinsäure (ABA) (DURING und ALLEWELDT 1973, 1974) abliefen, wobei auch hier sortenspezifische Unterschiede beobachtet wurden. So trat in den zitierten Untersuchungen der Gipfel der ABA bei Riesling im Oktober, bei Müller-Thurgau etwa 1 Monat später auf. Das Maximum der PO lag nach früheren Untersuchungen (SCHAEFER 1980) bei Riesling ebenfalls Mitte Oktober, bei Müller-Thurgau gleichfalls später. Nach den vorliegenden Untersuchungen zeigten Portugieser und Rotberger auch einen späteren Herbstgipfel der PO, der sich bis nach Ende Dezember hinzog und somit dem zweiten ABA-Höhepunkt bei Riesling entsprach. Allerdings fiel dann die Aktivität der PO nur allmählich ab, um erst zur Zeit des neuen Wachstums ein Minimum zu erreichen. Einen Anstieg der Aktivität einiger Isoenzyme der PO in der Ruheperiode haben auch KELLEY und ADAMS (1977) sowie SCHMID und FEUCHT (1981) bei anderen Pflanzen gefunden.

Es ist indessen nicht sicher, ob sich die Kurven der PO-Aktivität und der ABA zeitlich tatsächlich decken, da ABA-Analysen von uns nicht vorgenommen wurden. Spätere Untersuchungen müssen ergeben, ob hier wirklich eine Beziehung besteht, denn nach FRIES (1971) soll ABA die Aktivität der IAA-Oxidase steigern, die der PO aber hemmen.

Man nimmt heute allgemein an, daß die PO auch als β -Indolylessigsäure- (IAA)-Oxidase wirkt (GALSTON *et al.* 1953, und viele andere). Die Meinungen gehen jedoch darüber auseinander, ob jedes Isozym der PO auf die IAA einwirken kann (ENDO

1968). Orientierende Analysen haben gezeigt, daß zumindest ein Teil der PO-Isoenzyme der Rebe auch diese Funktion hat. Auch KOCHHAR *et al.* (1978) schließen, daß die langsamer laufenden Banden mit dem Einsetzen der endogenen Ruhe zu tun haben, die schnellsten hingegen mit dem Knospenaufbruch, wobei einige Isoenzyme IAA-Oxidase sein dürften. In ähnlicher Weise nahm in unseren Untersuchungen der Triebe von Rotberger und Portugieser die Anfärbungsintensität etlicher Banden mit der Dormanz zu; sie könnten ebenfalls die Funktion einer IAA-Oxidase haben. Das war auch im zweiten Jahr ersichtlich; da hier aber die Vegetation später abschloß, traten diese Vorgänge erst im Dezember auf.

Nach den oben angeführten Untersuchungen würde im Herbst die endogene Ruhe u. a. durch ABA eingeleitet und dabei die Knospenaustriebsbereitschaft unterdrückt, gleichzeitig würden Wuchsstoffe durch die IAA-oxidative Wirkung der PO inaktiviert. Die lange Nachwirkung der PO während der „exogen aufgezwungenen Ruhe“ (ALLEWELDT 1960) könnte das Wirksamwerden von Wuchsstoffen weiterhin verzögern, so daß es im Freiland normalerweise während des Winters nicht zum Austrieb kommen kann. Die PO wäre also einer der Inhibitoren des Austriebs. Das steht in Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren, wonach allgemein in Holzpflanzen ein Wuchsstoffminimum in der Zeit der Winterruhe und ein Maximum zur Zeit des Austriebs vorliegt (aus DURING und ALLEWELDT 1973).

Daß es aber in der Winterruhe dennoch zu einem Austrieb der Knospen kommen kann, z. B. durch gezielte Anwendung gewisser Chemikalien, mag auf der bekannten leichteren exogenen Beeinflussbarkeit der PO beruhen, deren IAA-oxidative Wirkung dann nachläßt und die Wuchsstoffe vorzeitig freigibt. So verändert sich z. B. bei der Unterbrechung der Knospenruhe durch Thioharnstoffe die Aktivität der PO und das Isoenzymmuster (KOCHHAR *et al.* 1978), ebenso bei der Behandlung der Trauben mit Etaphon (KOCHHAR *et al.* 1979). Möglicherweise wird die PO bzw. ihre IAA-regulierende Funktion also im Frühjahr durch die ansteigenden Temperaturen und vermutlich auch durch andere Faktoren beeinflusst, die zur Abnahme der Aktivität in einigen Isoenzymen zwischen Ende Februar und dem Austrieb führt. Dadurch kommt es (s. auch KOCHHAR *et al.* 1978) zu einer für den Austrieb optimalen Wuchsstoffschwelle. Das erklärt auch die Abwesenheit solcher Isoenzyme in Jungreben nach der Veredlung: Mehrere Wochen später sank die Aktivität der PO stark ab, und zwar um so mehr, je besser die Kallusbildung war (SCHAEFER 1982 b).

Im Gegensatz zu KOCHHAR *et al.* (1978) konnten wir beim Knospenaufbruch mit Ausnahme der Unterlage 5 BB keine Neusynthese von sehr schnell wandernden Isoenzymen beobachten. Dies und auch die zum Teil abweichenden R_f -Werte der Isoenzyme in den unsrigen und in den Untersuchungen der genannten Autoren kann auf unterschiedlicher Analysentechnik beruhen.

Die flache Aktivitätskurve der PO bei den Wurzeln ist wohl durch das Fehlen einer ausgesprochenen Ruheperiode (ALLEWELDT 1960) bedingt.

Physiologisch unklar ist die häufig beobachtete, vorübergehende Abnahme der PO-Aktivität im November.

Mit dem zusätzlichen Auftreten bzw. der stärkeren Anfärbbarkeit einiger Isoenzyme im April bzw. Ende Mai sowie einem Zuwachs der Gesamtaktivität im Mai in den Wurzeln fällt zeitlich ein sehr erheblicher Abbau von Kohlenhydraten und Protein und meist auch ein starker Abtransport von N-haltigen Substanzen sowie eine hohe Aktivität der sauren Phosphatase (SCHAEFER 1981, 1982 a) zusammen. Nach TOMBESI *et al.* (1952) soll eine starke Aktivität von Oxidasen wie auch der PO bei der Steigerung des Abbaustoffwechsels und des Stofftransportes zu anderen Organen auftreten. Das mag auch hier zutreffen; es waren jedoch bei den Trieben und Stämmen z. T. verschiedene Isoenzyme beteiligt. Da dieser Prozeß bei den nichttraubentragenden Reben nicht

beobachtet wurde, ist hier ferner an eine Beteiligung der PO an der einige Wochen später einsetzenden Blütenbildung zu denken.

Die Aktivitätszunahme der PO Ende Mai in den Wurzeln könnte mit der verstärkt einsetzenden Rhizogenese zusammenhängen, da hierbei die PO ebenfalls eine Rolle spielen soll (IANNINI *et al.* 1976, BHATTACHARYA *et al.* 1978). Bei den Jungreben wurde dies nicht beobachtet, ihre Wurzelbildung war zu dieser Zeit noch minimal (SCHAEFER 1978 a) und konnte sich daher noch nicht im elektrophoretischen Muster ausdrücken.

Eine Klärung der noch offenen Fragen kann nur unter Einbeziehung von Analysen weiterer Wirkstoffe oder experimentell erfolgen. Es dürfte aber von großem Vorteil sein, sowohl Aktivitätsbestimmungen als auch Isoenzymanalysen durchzuführen, da erst dadurch eine größere Aussagekraft erreicht werden kann.

Zusammenfassung

Die Jahresrhythmik der Peroxidase (PO) wurde in verschiedenen Rebensorten durch Analyse der anionischen Isoenzymverteilung und durch Bestimmungen der Gesamtaktivität untersucht. Im Herbst erfolgte ein Anstieg der Aktivität der PO mit einem Gipfel zwischen Ende November und Ende Dezember. Eine Beziehung zu der Ruheperiode und zur Abscisinsäure wird angenommen. Im Laufe des Winters und besonders ab Austriebsbeginn nahm die Aktivität wieder ab. Da etliche Isoenzyme auch als IAA-Oxidase wirksam sein können, wird ein Zusammenhang mit der Steuerung der Wuchsstoffbildung vermutet. Die leichte Beeinflussbarkeit der PO durch exogene Faktoren kann erklären, warum es in der Nachruhe durch Applikation gewisser Substanzen oder durch Temperatursteuerung zu einem Knospenaufbruch kommt.

Die Enzymaktivität war am stärksten in den Trieben und Stämmen. In den Wurzeln waren die Aktivitätsveränderungen weit geringer.

Eine direkte Beziehung zur Holzreife ist nicht erkennbar. Der Aktivitätsanstieg der PO im April in den Wurzeln und die Verstärkung bzw. Neusynthese von einigen Isoenzymen in den Stämmen und Trieben im Mai können im Zusammenhang mit der Wurzelbildung und dem zu dieser Zeit noch schwachen Triebwachstum stehen. Das PO-Minimum im Sommer korreliert mit dem starken Wachstum und weist auch wieder auf eine Beteiligung an der Wuchsstoffregulierung hin.

Ich danke dem Forschungsring des Deutschen Weinbaues für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Den Herren Dr. SCHUMANN und Dr. FADER danke ich für die Überlassung des Rebenmaterials. Besonderer Dank gebührt Herrn K. MICHELMICHEL für die sehr sorgfältige Durchführung der Analysen.

Literatur

- ALLEWELDT, G., 1960: Untersuchungen über den Austrieb der Winterknospen von Reben. *Vitis* 2, 134—152.
- BHATTACHARYA, N. C., BHATTACHARYA, S. and NANDA, K. K., 1978: Isoenzyme polymorphism of peroxidase, IAA-oxidase, catalase and amylase in rooting etiolated stem segments of *Salix tetrasperma*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 172, 439—452.
- BURRIS, R. H., 1960: Hydroperoxidases (peroxidases and catalases). In: RUHLAND, W. (Hrsg.): *Handbuch der Pflanzenphysiologie* Bd. XII/1, 365—400. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- DÜRING, H. und ALLEWELDT, G., 1973: Der Jahresgang der Abscisinsäure in vegetativen Organen von Reben. *Vitis* 12, 26—32.
- — — und — — —, 1974: Abscisinsäureuntersuchungen in Blättern, Sproßachsen und Beeren von Reben. *Wein-Wiss.* 29, 315—322.

- ENDO, T., 1968: Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes. *Plant and Cell Physiol.* **9**, 333—341.
- FREUDENBERG, K., 1956: Beiträge zur Erforschung des Lignins. *Angew. Chem.* **68**, 508—512.
- FRIC, F. und FUCHS, W. H., 1970: Veränderungen der Aktivität einiger Enzyme im Weizenblatt in Abhängigkeit von der temperaturlabilen Verträglichkeit für *Puccinia graminis tritici*. *Phytopathol. Z.* **67**, 161—174.
- FRIES, D., 1971: Action de l'acide abscissique sur la croissance et l'activité auxine-oxydasique des racines de lentille. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sér. D.* **272**, 2884—2887.
- GALSTON, A. W., BONNER, J. and BAKER, R. S., 1953: Flavoprotein and peroxidase as components of the indoleacetic acid oxidase system of peas. *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 456—470.
- GOVE, J. P. and HOYLE, M. C., 1975: The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in birch and horseradish. *Plant Physiol.* **56**, 684—687.
- IANNINI, B., RIDOMI, A. e POL, R., 1976: Evoluzione di alcuni parametri durante il radicamento di talee di vite. *Riv. Viticolt. Enol. (Conegliano)* **29**, 65—75; 91—103.
- KELLEY, W. A. and ADAMS, R. P., 1977: Seasonal variation of isozymes in *Juniperus scopulorum*: systematic significance. *Amer. J. Bot.* **64**, 1092—1096.
- KOCHHAR, S., KOCHHAR, V. K. and KHANDUJA, S. D., 1978: Changes in the pattern of isoperoxidases in the dormant canes of Thompson seedless grapes. *Amer. J. Enol. Viticult.* **29**, 137—138.
- — — and — — —, 1979: Changes in the pattern of isoperoxidases during maturation of grape berries cv. Gulabi as affected by ethephon (2-chloroethyl)phosphonic acid. *Amer. J. Enol. Viticult.* **30**, 275—277.
- PAUL, K. G., 1963: Peroxidases. In: BOYER, P. D., LARDY, H. and MYRBÄCK, K. (Eds.): *The enzymes*, Vol. **8**, 2nd Ed., 227—274, Academic Press, New York and London.
- SCHAEFER, H., 1971: Vergleichende Untersuchungen über das Auftreten von Isoenzymen der Peroxydase in den Blättern und Triebspitzen der Rebe. *Wein-Wiss.* **26**, 112—134.
- — —, 1977: Über die Extraktion von Proteinen und Enzymen aus verholzten Rebenorganen. I. Extraktion für die elektrophoretische Auftrennung. *Wein-Wiss.* **32**, 269—288.
- — —, 1978 a: Der Proteinstoffwechsel der Jungreben in der Rebschule. *Weinberg und Keller* **25**, 331—352.
- — —, 1978 b: Über die Extraktion von Proteinen und Enzymen aus verholzten Rebenorganen. II. Extraktion für die quantitative Proteinbestimmung. *Wein-Wiss.* **33**, 81—102.
- — —, 1980: Vergleichende Untersuchungen des Stoffwechsels verschiedener Internodien von 3 Rebsorten. *Wein-Wiss.* **35**, 259—280.
- — —, 1981: Der jahreszeitliche Verlauf des Stoffwechsels der löslichen und unlöslichen Proteine in den verholzten Rebenorganen. *Wein-Wiss.* **36**, 3—20.
- — —, 1982 a: Jahreszeitlicher Verlauf und vermutliche Bedeutung der Phosphorylase und sauren Phosphatase in verholzten Organen von *Vitis*. *Vitis* **21**, 299—312.
- — —, 1982 b: Physiologische Untersuchungen zur Veredlungsaffinität und Kallusbildung der Reben. I. Untersuchungen an einfachen und veredelten Stecklingen. II. Analysen des Kallus. *Wein-Wiss.* **37**, 147—160; 219—233.
- SCHMID, P. P. S. and FEUCHT, W., 1981: Proteine, Enzyme und Polyphenole im Phloem von Kirschtrieben in Abhängigkeit von der saisonalen Sproßentwicklung. *Gartenbauwiss.* **46**, 228—233.
- SCHRAUWEN, J., 1966: Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamid-Säulchen. *J. Chromatography* **23**, 177—180.
- TOMBESI, L., BAROCCIO, A., CERVIGNI, T., FORTINI, S., TARANTOLA, M. e VENEZIAN, M. E., 1952: Attività ossidativa, catalasica, carboanidrasica, perossidasi e contenuto in glutazione ridotto ed acido ascorbico nel corso della maturazione di frutti e semi. *Nota I. Ann. Speriment. Agr. (Roma)* **6**, 857—874.

Eingegangen am 26. 4. 1982

Dr. H. SCHAEFER
Landes-Lehr- und Forschungsanstalt
für Landwirtschaft, Weinbau und
Gartenbau
D 6730 Neustadt